

Sluttrapport for FHF - prosjektet
Metodeutvikling og validering av
toksafen-forbindelser

Validering av metode til bestemming av 8 kjemiske former av
toksafen: 26, 32, 40+41, 42a, 44, 50 og 62

FHF - Prosjektnummer 232034

2007

Britt Elin Rolfsnes og Kåre Julshamn

Nasjonalt institutt for ernærings- og sjømatforskning (NIFES)
Postboks 2029 Nordnes, 5817 Bergen

www.NIFES.no

Samandrag

I dette prosjektet er det utvikla ein analysemetode til bestemming av åtte kjemiske former for toksafen: (toksafen 26, 32, 40, 41, 42a, 44, 50, 62) i fiskefilet, fiskefôr, marine mammalia og marine oljer med GC/MS teknikk.

Eksisterande metode ved NIFES for bestemming av 4 kjemiske former for toksafen (26, 32, 50, 62) har bestemmingsgrense (LOQ) 0,0025 mg/kg prøve for toksafen 26 og 50 og 0,0015 mg/kg prøve for toksafen 32 og 62. Det var ei målsetjing i den nye metoden å seinka LOQ for desse forbindelsane, samt å inkludera fire nye kjemiske former for toksafen (40, 41, 42a, 44) etter tilråing frå EFSA (den europeiske vitenskapskomiteen for mattrygghet).

Bestemmingsgrensene (LOQ) i den nye metoden varierer mellom ulike prøvematriser og dei ulike kjemiske formene av toksafen. For dei fleste prøvematriser er $LOQ < 0,001$ mg/kg prøve. Toksafen 44 har ei noko høgare bestemmingsgrense for dei ulike prøvematrisene som er validerte. Toksafen 40 og 41 vert oppgitt som sum av dei to kjemiske formene pga kromatografisk overlapp og samanfallande massar. Riktighet er testa ved gjenfinningsforsøk. Resultata er tilfredsstillande. Måleusikkerheten er målt som $2 \times RSD(\%) + 15\%$ der RSD er intern reproduserbarhet. Måleusikkerheten ligg mellom 7 og 45%.

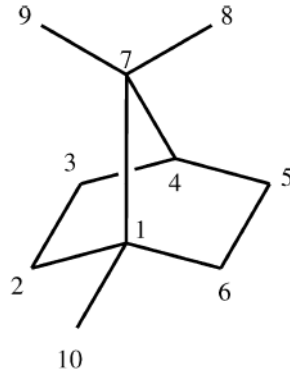
Metoden er validert og er implementert på NIFES laboratorium for framandstoff, og inngår no i instituttet sine overvakings- og forskningsprosjekt.

Bakgrunn

Toksafen vart frå 1970åra eit av dei mest brukte pesticida på verdsbasis som erstatning for DDT. Toksafen har først og fremst vore brukt som insekticid i landbruket, og aller mest i bomullsproduksjon. Toksafen er no utfasa i den vestlege verda, men produksjonen held fram i enkelte land, mellom anna Russland.

Toksafen er ei kompleks teknisk blanding av eit stort antal beslekta klorerte sambindingar, dei fleste klorerte bornaner (sjå figur 1) med mellom 7 og 9 kloratom. Mange av desse

sambindingane er persistente. Dei er feittløyslege, og bioakkumulerer difor i feittrikt vev. Langtransport gjennom luft og vatn har ført toksafen også til nordlege område og finst her først og fremst i det marine miljø. Høge nivå er funne i feit fisk og marine pattedyr. Toksafen har høg toksisitet for fisk.



Figur 1: Bornan

Norsk fiskerinæring er først og fremst ei eksportnæring. For å lukkast på dei ulike internasjonale marknadane er det mellom anna viktig å kunna dokumentera at norsk sjømat er trygg mat. Dette inneber kunnskap om at nivået av ulike framandstoff, deriblant toksafen, i sjømat er akseptabelt.

I ei tilråing frå EFSA vert det rådd til å kontrollera nivået av 8 ulike kjemiske former for toksafen i marine prøvematriser: 26, 32, 40, 41, 42a, 44, 50 og 62. Mellom desse skil toksafen 32 seg ut som ikkje persistent, og vil såleis vera ein indikator for nyleg eksponering for toksafen.

Ekperimentelt

Analysemetode

- Ei prøvemengd tilsvarande 0,5 – 1 g feitt vert vegd i porselensskål, knust og blanda med hydromatriks. Prøven vert ekstrahert på ASE (Accelerated Solvent Extractor; ASE 300TM, Dionex, USA) med ei blanding av heksan og diklormetan (20 + 80) som ekstraksjonsmiddel. Ekstraksjonscellene vert pakka på følgjande måte nedanfrå: ca 1 g hydromatriks – ca 19 g av ei blanding kieselgel + svovelsyre (1+1) for nedbryting av feitt – blanding av prøve / hydromatriks – intern standard – hydromatriks.

- Ekstraktet vert oppkonsentrert til ca 0,75 ml ved inndamping med varme og nitrogengass på TurboVap (Turbo VapII™, Zymark, USA).
- Ekstraktet vert overført til 10 ml sentrifugerøyr. TurboVaprøyet vert vaska med ca 3 ml heksan som også vert overført til sentrifugerøyet.
- Prøvane vert tilsett 1 – 2 ml konsentrert svovelsyre for å bryta ned restar av feitt som er igjen etter ekstraksjon. Mengda svovelsyre vert vurdert ut frå feittinnhaldet i prøven, og for prøvar med særleg høgt feittinnhald kan ein tilsetja opp til 4 ml syre. Totalvolum vert justert med heksan til ca 10 ml, blandinga vert miksa lett på wortex. Etter ca 30 min. henstand vert prøven sentrifugert i 17 – 18 min. ved 2800 rpm. Øvste fase, organisk, vert så overført til 10 ml konisk sentrifugerøyr, plassert i Multi-Block Heater og dampa inn til ca 1 ml på 40 °C ved svak gjennomblåsing av nitrogen gass. For ekstra kontroll med feittfjerning vert det foreteke ei siste syrebehandling ved tilsats av 200 µl svovelsyre, forsiktig miksing på minishaker og deretter sentrifugering i 3-4 min. ved 1000 rpm. Organisk fase vert overført til Autosamplerglas, tilsett 500 µl nonan og miksa på minishaker. Inndampinga held fram til eit totalvolum på ca 300 µl, og det vert tilsett gjenvinningsstandard.
- Sluttbestemminga vert utført med GC/MS (TRACE GC Ultra™ /DSQ™ Single Quadropol GC/MS, Thermo Fisher Scientific, Tyskland) med negativ kjemisk ionisasjon i SIM mode.
- Prøvane vert analyserte i ein sekvens som inneheld kalibreringskurve (4 pkt), kontrollmateriale og metodeblank. Kalibreringskurva vert tillaga direkte frå stockløyising av standard, intern standard og gjenvinningsstandard, utan opparbeiding. Kontrollmateriale og metodeblank vert opparbeida etter same prosedyre som prøvane.
- Oljeprøvar vert ikkje ekstraherte på ASE, men vert løyst direkte i heksan og følgjer deretter prosedyren frå syrebehandlinga.

Kvalitetskontroll av analysemetoden

Kvantifiseringsgrense (LOQ)

Deteksjons- og kvantifiseringsgrenser er bestemt for matrisene laksemuskel, fôr, marine oljer og marine mammalia. Grensene er bestemt ved å integrera ein støytopp i området omkring

retensjonstida til den aktuelle analytten og berekna nivået av denne (ng/g). LOD er sett til 3 gonger nivået av støytoppen, LOQ er sett til 3*LOD. Resultata er ført inn i tabell 1.

Tabell 1: Måleområde

Analytt	Matriks	Deteksjonsgrense LOD (ng/g våt vekt)	Kvantifiserings- grense LOQ (ng/g våt vekt)	Øvre kvanti- fiseringsgrense ULOQ (ng/g våt vekt)
CHB 26	Laksemuskel	0,10	0,30	50
	Fôr	0,15	0,40	30
	Marine oljer	0,20	0,50	100
	Marine mammalia	0,20	0,50	100
CHB 32	Laksemuskel	0,20	0,60	50
	Fôr	0,40	1,10	30
	Marine oljer	0,25	0,80	100
	Marine mammalia	0,25	0,80	100
CHB 40+41	Laksemuskel	0,10	0,30	50
	Fôr	0,20	0,60	30
	Marine oljer	0,07	0,20	100
	Marine mammalia	0,07	0,20	100
CHB 42a	Laksemuskel	0,10	0,35	50
	Fôr	0,25	0,70	30
	Marine oljer	0,10	0,30	100
	Marine mammalia	0,10	0,30	100
CHB 44	Laksemuskel	0,50	1,50	50
	Fôr	0,80	2,50	30
	Marine oljer	2,00	6,00	100
	Marine mammalia	2,00	6,00	100
CHB 50	Laksemuskel	0,03	0,10	50
	Fôr	0,06	0,20	30
	Marine oljer	0,07	0,20	100
	Marine mammalia	0,07	0,20	100
CHB 62	Laksemuskel	0,20	0,55	50
	Fôr	0,35	1,00	30
	Marine oljer	0,60	1,80	100
	Marine mammalia	0,60	1,80	100

Riktighet

Riktighet vart målt ved gjenfinning. Gjenfinning vart berekna ved å analysera laksemuskel tilsett standard på middels og høgt nivå; ca 15 ng/g og ca 50 ng/g. Tabell 2 viser gjennomsnitt av 5 parallellar. Resultata er tilfredsstillande.

Tabell 2: Riktighet som gjenfinning.

Analytt	Nivå	Gjennomsnitt (%)	RSD (%)
CHB 26	Høgt	103	6,1
	Middels	102	3,1
CHB 32	Høgt	107	2,8
	Middels	102	3,4
CHB 40 + 41	Høgt	105	5,8
	Middels	104	2,6
CHB 42a	Høgt	107	5,0
	Middels	104	3,5
CHB 44	Høgt	124	5,8
	Middels	111	6,0
CHB 50	Høgt	112	10
	Middels	110	7,1
CHB 62	Høgt	118	5,1
	Middels	113	6,1

Usikkerhet

Intern reproduserbarhet (IR) er berekna for alle matrisene som har inngått i valideringa. For kvar matrise er det analysert 5 parallellar som er spreidde over 5 dagar. Intern reproduserbarhet, gitt som RSD(%) varierer mellom 2 og 19% for dei undersøkte matrisene.

Måleusikkerheten er fastsett med utgangspunkt i RSD(%) frå intern reproduserbarhet og er definert ved eit 95% konfidensintervall, som $2 * RSD_{IR} + 15\%$.

Tabell 3. Måleusikkerhet i %

	CHB 26 (%)	CHB 32 (%)	CHB 40+41 (%)	CHB 42a (%)	CHB 44 (%)	CHB 50 (%)	CHB 62 (%)
Laksemuskel	13	8	7	10	23	17	11
Fôr	10	10	9	14	40	13	21
Marine oljer	23	25	11	23	45	28	35
Marine mammalia	23	25	11	23	45	28	35

Konklusjon

Analysemetoden er validert og er implementert på NIFES laboratorium for framandstoff, og inngår no i instituttet sine overvakings- og forskningsprosjekt.